運用酶切差異設計單一核苷酸多型性分子標誌

農試所作物組 平嘉雲 吳東鴻 李長沛 賴明信

一、前言

近年來因氣候變遷造成頻繁的極端天氣已嚴重影響栽培環境，也提高了作物生產風險。為有效提升作物對逆境環境的調適能力並加速品種選育，可藉由分子標誌輔助選拔法，及早從雜交後裔中選出攜有目標基因的優良品系。然基因型選拔是藉由兩親本間的核苷酸多型性差異來辨別後裔的遺傳背景，需仰賴大量且方便操作的分子標誌以協助監測遺傳重組狀況。隨著2005年公布水稻全基因組核苷酸序列後，已知在秈稻、稉稻兩亞種間存有1,703,176個單一核苷酸多型性(Single Nucleotide Polymorphisms, SNP)，相當於在水稻基因組中每268bp存在1個SNP，在全基因組的密集度首屈一指，若能活化運用SNP將可進一步提升分子標誌的利用性。目前SNP的偵測方式大多仰賴高階螢光分析儀或微陣列晶片進行高通量批次分析，但對於小型專案開發或高歧異雜交組合育種計畫，則因單一篩選條件之樣品數太少而無法負擔龐大分析門檻，且過去慣行電泳分析係仰賴聚合酶鏈反應(Polymerase Chain Reaction, PCR)產物片段大小來區分多型性，可是同一區域若僅有核苷酸種類差異而非核苷酸數量差異，便無法藉由膠體電泳區分開PCR產物。對此本文將介紹利用限制酶處理方法來顯現核苷酸差異，將SNP偵測轉化為PCR反應與普通電泳設備可使用的酶切擴增多型性(Cleaved Amplified Polymorphic Sequence, CAPS)與衍生酶切擴增多型性(derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequence, dCAPS)分子標誌，以提升分子標誌之應用與開發。

作　　者：吳東鴻助理研究員
連絡電話：04-23317106

二、CAPS分子標誌原理與設計

CAPS分子標誌同時結合了PCR與RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism，限制片段長度多型性)兩種技術，主要是先透過PCR技術將目標區段大量複製，再以限制酶酶切PCR產物，比較酶切後的條帶圖譜，藉由各種限制酶搭配不同PCR產物可以產生大量多型性。因是依靠PCR、限制酶與電泳技術來確認多型性，比起過去以探針雜合為技術基礎的分子標記更為簡便、省時。CAPS的PCR引子可經由已知序列設計得來，甚至可進一步針對有功能性的區域篩選多型性，因此十分適合應用在篩選帶有目標功能性基因的育種選拔；

此外，CAPS是屬於共顯性遺傳標誌，亦利於雜交後裔的遺傳背景判定。

當SNP位點是落於限制酶切點上，該變異可經由CAPS標誌顯現出來。一般的設計流程是先經序列比對出SNP位點後，以Primer3或Primer Premier 5.0等軟體設計PCR引子來擴增包含SNP的片段，再利用限制酶對PCR產物進行酶切，最後以電泳分析產物片段的差異來辨認多型性。

常用來分析SNP是否符合限制酶酶切位點的軟體為SNP2CAPS(http://pgrc.ipk-gatersleben.de/snp2caps/)，此軟體可同時分析多筆經比對過的序列，也可將小片段的缺失或插入變異轉化成CAPS標誌，然此軟體需載入經過序列比對(alignment)的FASTA格式檔，使用者還需會操作有關序列比對的軟體。在此介紹sol genomics network網站所提供免費線上軟體CAPS Designer (http://solgenomics.net/tools/caps_designer/caps_input.pl)，操作流程如下：

(一)在大方格中可輸入經序列比對軟體輸出的CLUSTAL alignment檔案，也可直接輸入FASTA格式的序列檔，最多可輸入12條。FASTA格式係在符號「>」後寫上基因或基因座名稱，再加上底線「_」，底線後接著SNP的核苷酸種類，換行後貼上序列的文字檔即可。

(二)選擇輸入的檔案格式種類。

(三)設定搜尋限制酶的條件，可限定選用價錢低於$65 USD/1000 U的限制酶、離序列頭尾多少位點才開始搜尋酶切位點以及可容許出現幾次酶切位點，這三項可依CAPS標誌設計目標而有所調整。

資料送出後所得到的結果會顯現候選限制酶的價格、在序列上的酶切位點以及被酶切後所產生的片段大小，可依照經費、電泳洋菜瓊脂的濃度、酶切片段的次數來做選擇。為達到最經濟且最易判斷的電泳結果，可選擇實驗室已有或是價格優惠又普遍的限制酶，而酶切後產生的條帶差異最大者為另一重要考量要點。此網頁軟體勝過SNP2CAPS的地方在於結合限制酶生產廠商NEW ENGLAND BioLab (http://www.neb.com/nebecomm/default.asp)所生產的商業化限制酶和其價格，提供的候選限制酶已有商業化產品，且可直接比較各種候選限制酶的價格，選擇實驗室經費許可的限制酶，而不需額外確認限制酶是否有商業化以及一筆筆搜尋限制酶的價格。此外，輸入的序列不需用其他比對軟體先進行分析，只需貼上在相同位點具有SNP的等長文字序列即可。建議直接貼上確定擴增出的PCR產物序列，如此在輸出結果中所呈現的酶切片段大小將可預期電泳結果，也可直接挑選將PCR產物酶切成最少片段的限制酶。

三、dCAPS分子標誌原理與設計流程

只有當核苷酸變異是落於限制酶切點上，該變異才能經由CAPS標記顯現出來，因此若沒有商業化限制酶可直接辨識SNP位點時，便無法設計CAPS標誌來區分多型性。對此，就有學者衍生出另一種設計方式，藉以解決該項瓶頸，即在其中一條PCR引子上，人為創造一個錯誤黏合位點以迎合限制酶切位，隨後藉由限制酶酶切該人為改變點與SNP組合而成的切位，此種即為dCAPS標誌(圖一)。

dCAPS Finder 2.0 (http://helix.wustl.edu/dcaps/dcaps.html)是一免費網路軟體，可提供適合發展成CAPS或dCAPS標

誌的限制酶，另外還可提供dCAPS的引子序列(Neff et al., 2002)。網頁頁面十分簡單，操作流程如下：

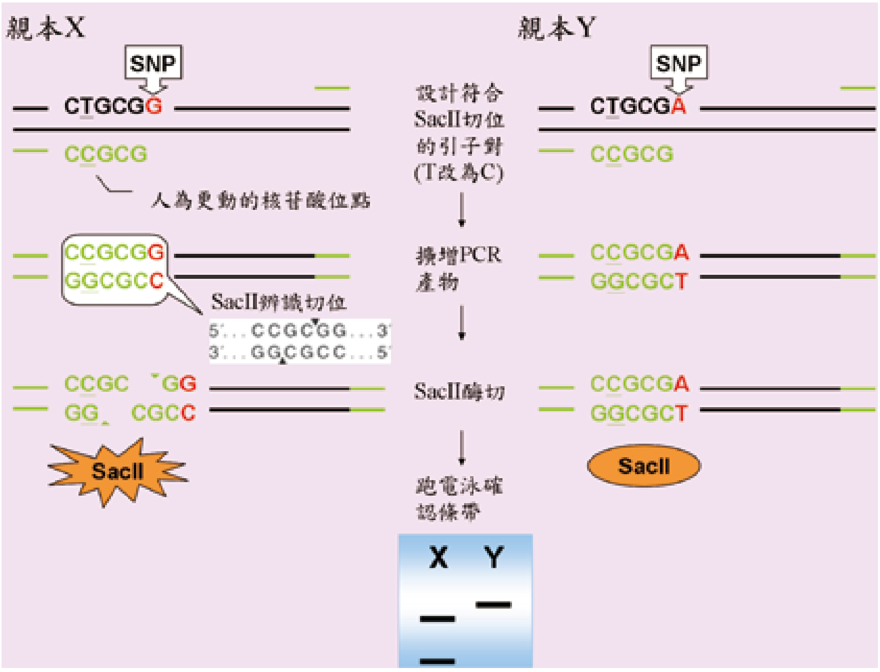
(一)在兩欄位中各輸入包含SNP位點前後約15-25個核苷酸的等長序列，此序列不可有空格或非A、T、C、G的字元或符號，序列總長不超過60 bp。

(二)輸入可容許之錯誤黏合(mismatch)的核苷酸數量。

(三)資料輸入完畢即可點擊「Submit」送出資料，等待軟體運算的結果。

若在錯誤黏合的核苷酸數量 (第2步驟的欄位)中輸入0，則只列出可辨識SNP位點差異的限制酶，即發展成CAPS標誌，不過dCAPS Finder 2.0只提供可用的限制酶，並沒有提供引子對的功能，因此需另外使用引子設計軟體針對目標酶切位點設計引子。

若錯誤黏合核苷酸數量是1以上，dCAPS Finder 2.0會提供兩親本正向引子(forward primer)或反向引子(reverse primer)上被改變核苷酸位點的序列以及可使用的限制酶，圖二中被上色的位點即為調整過的錯誤黏合核苷酸，依照選用的單股引子與限制酶可發展成dCAPS標誌。然而dCAPS Finder 2.0只提供單邊的可能性引子序列，使用者仍須藉由其他設計引子軟體設計出另一股搭配的引子。此外，dCAPS標誌中的錯誤黏合核苷酸位點會降低引子的親和性以及專一性，因此錯誤黏合的核苷酸數量不宜過多，且錯誤黏合的位點最好不要落在引子3’端的最後兩個位點，不然會使引子3’端翹起而無法做出PCR產物 (Komori and Nitta, 2005)。要成功設計出dCAPS標誌還需特別注意引子長度和PCR產物大小的關係，被酶切與無酶切的兩種條帶大小差異要夠大才可被洋菜瓊脂分開，因酶切位點是設計在引子上，表示經酶切後所產生的差異幾乎等同於引子片段大小，而普通膠體對大片段PCR產物區別能力不佳，因此需調整PCR產物大小、引子長度和電泳膠片濃度以提高多型性區別度。



圖一、dCAPS標誌的原理與操作流程。將引子設計在SNP位點之前，改變引子上的核苷酸而人為創造出符合SacII辨識的切位，再以酶切產生的條帶來區分親本X和親本Y所帶有的SNP種類。

圖二、dCAPS Finder 2.0所呈現的結果。

圖三、本所自行開發的抗病性dCAPS標誌，可準確判別具有抗病性的品種。抗病品種之PCR產物被酶切，產物大小為145 bp (R)；感病品種之PCR產物不被酶切，產物大小為170 bp (S)；異質結合體同時具有兩條帶(H)。

四、結語

利用分子標誌來輔助選種可有效選拔由多基因控制且不易用目視區分的數量性狀，讓育種者在生育早期藉由基因型分析淘汰品系得以提高選拔強度，並在加速選拔下可較傳統育種計畫縮短選拔的世代數，同時兼顧提早固定品系又避免目標基因流失，提前將資源配置於高潛力雜交後裔中，進而大幅減少田間試驗規模。而運用豐富的SNP與酶切差異所設計成的CAPS和dCAPS標誌更因操作簡便、設備門檻較低、篩選遺傳背景更為明確而有更高的應用彈性，例如本所在半年內針對水稻抗稻熱病、抗白葉枯病、抗褐飛蝨、產量性狀等多個重要農藝性狀，藉由CAPS和dCAPS標誌區別控制目標性狀上的SNP多型性，其標誌的多型性辨別力高與清晰(圖三)，且可快速又大規模的進行篩選。因此為利用SNP多型性進行分子輔助選種，熟悉CAPS和dCAPS標誌的操作與開發，將有助於現代育種者靈活應用分子標誌建立選拔工具。

五、參考文獻

Komori, T. and N. Nitta. 2005. Breeding Sci. 55: 93-98.

Neff, M. M., E. Turk, and M. Kalishman. 2002. Trends Genet. 18: 613-615.

Thiel, T., R. Kota, I. Grosse, N. Stein, and A. Graner. 2004. Nucl. Acids Res. 32: e5.